

Title: JP5168493A2: MONOCLONAL ANTIBODY AGAINST PSEUDOMONAS AERUGINOSA ELASTASE

Country: JP Japan
Kind: A

Inventor(s): YOKOTA SHINICHI
OTSUKA HIROSHI
NOGUCHI HIROSHI

Applicant/Assignee:



SUMITOMO CHEM CO LTD
SUMITOMO PHARMACEUT CO LTD

News, Profiles, Stocks and More about this company

Issued/Filed Dates: July 2, 1993 / Nov. 29, 1991

Application Number: JP1991000316498

IPC Class: C12P 21/08; A61K 39/395; A61K 39/395; C07K 15/28;
C12N 5/20; G01N 33/573; G01N 33/577; C12N 15/06;
G01N 33/569; C12P 21/08;

Priority Number(s): Nov. 29, 1991 JP1991000316498

Abstract:



Purpose: To obtain a novel monoclonal antibody which has activity specifically linking to Pseudomonas aeruginosa elastase to neutralize the toxicity, thus can be used in determination of a trace amount of Pseudomonas aeruginosa elastase and as a diagnostic, prophylactic and therapeutic agent for the infectious diseases caused by Pseudomonas aeruginosa.

Constitution: Purified Pseudomonas aeruginosa elastase is dialyzed against a phosphate buffer solution of pH7.2 and the product is used as an immunogen by mixing with Freund's complete adjuvant and the mixture is subcutaneously given to BALB/c mouse for immunization. The mouse is given the booster and the splenic cells are collected after the final immunization. The spleen cell is fused with a mouse myeloma cell using polyethylene glycol and cultured in HAT medium to obtain the hybridoma cells. The clones producing anti- Pseudomonas aeruginosa elastase antibody are selected from the hybridoma cells, then the cells are cloned by the limiting dilution analysis and the monoclonal hybridoma is cultured to produce the monoclonal antibody against Pseudomonas aeruginosa elastase.
COPYRIGHT: (C)1993,JPO&Japio

Family: Show known family members - none .

Other Abstract Info: CHEMABS 119(17)179185Q CAN119(17)179185Q DERABS
C93-247580 DERC93-247580

Foreign References: No patents reference this one



Nominate this
for the Gallery...



[View Image](#)

[1 page](#)

(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-168493

(43)公開日 平成5年(1993)7月2日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 P 21/08		8214-4B		
A 6 1 K 39/395	P	8413-4C		
	ADZ R	8413-4C		
		7236-4B	C 1 2 N 5/ 00	B
		8931-4B	15/ 00	C
審査請求 未請求 請求項の数14(全 11 頁) 最終頁に続く				

(21)出願番号 特願平3-316498

(22)出願日 平成3年(1991)11月29日

(71)出願人 000002093

住友化学工業株式会社

大阪府大阪市中央区北浜4丁目5番33号

(71)出願人 000183370

住友製薬株式会社

大阪府大阪市中央区道修町2丁目2番8号

(72)発明者 横田 伸一

兵庫県宝塚市高司4丁目2番1号 住友化学工業株式会社内

(72)発明者 大塚 浩史

兵庫県宝塚市高司4丁目2番1号 住友化学工業株式会社内

(74)代理人 弁理士 諸石 光▲ひろ▼ (外1名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 緑膿菌エラスターゼに対するモノクローナル抗体

(57)【要約】

【構成】緑膿菌エラスターゼに特異的に結合し、その毒素中和活性を有するモノクローナル抗体、該モノクローナル抗体を産生するセルライン及び該モノクローナル抗体を含有する緑膿菌感染症の予防・治療剤に関する。

【効果】本発明のモノクローナル抗体は、緑膿菌エラスターゼの酵素活性部位に直接相互作用することにより強い阻害活性を発揮し、その結合が金属プロテアーゼにより阻害される。また、本発明のモノクローナル抗体は、緑膿菌エラスターゼに特異的に結合するが、ドキソイド化された緑膿菌エラスターゼには結合しない。該モノクローナル抗体は毒素中和活性を有するので、有効な緑膿菌感染症治療剤を提供する。さらに、本モノクローナル抗体により、極微量の緑膿菌エラスターゼの検出法及び定量法を提供し、緑膿菌感染診断薬やエラスターゼ定量試薬として応用される。

【特許請求の範囲】

【請求項1】緑膿菌エラスターゼに特異的に結合し、毒性中和活性を有するモノクローナル抗体

【請求項2】緑膿菌エラスターゼに特異的に結合し、その結合が金属プロテアーゼ阻害剤によって阻害されることを特徴とするモノクローナル抗体

【請求項3】金属プロテアーゼ阻害剤がホスホラミドンあるいは $\text{HO}-\text{NHCO}-\text{CH}(\text{CH}_2-\text{CH}(\text{CH}_3)_2)-\text{CO}-\text{Ala}-\text{Gly}-\text{NH}_2$ であることを特徴とする請求項2記載のモノクローナル抗体

【請求項4】緑膿菌エラスターゼに特異的に結合するが、トキシノイド化された緑膿菌エラスターゼには結合しないことを特徴とするモノクローナル抗体

【請求項5】モノクローナル抗体がIgGであることを特徴とする請求項1、2、3あるいは4項記載のモノクローナル抗体

【請求項6】請求項1、2、3、4あるいは5記載のモノクローナル抗体における抗原結合に関与する部位を含む抗体断片

【請求項7】抗体断片がFab部位であることを特徴とする請求項6記載の抗体断片

【請求項8】抗体断片がFv部位であることを特徴とする請求項6記載の抗体断片

【請求項9】請求項1、2、3あるいは4記載のモノクローナル抗体を産生することを特徴とする細胞株

【請求項10】細胞株ET-4D3（微工研菌寄12288号）

【請求項11】細胞株ET-4D3が産生するモノクローナル抗体

【請求項12】請求項1、2、3あるいは4記載のモノクローナル抗体を産生する細胞株を培養することを特徴とするモノクローナル抗体の製造方法

【請求項13】細胞株ET-4D3（微工研菌寄12288号）を培養することを特徴とするモノクローナル抗体の製造方法

【請求項14】請求項1、2、3、4、5、6、7、8あるいは11記載のモノクローナル抗体または抗体断片を含む緑膿菌感染症予防・治療剤

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は緑膿菌エラスターゼに特異的に結合し、その毒性中和活性を有するモノクローナル抗体、該モノクローナル抗体を産生するセルライン、及び該モノクローナル抗体を含有する緑膿菌感染症の予防・治療剤に関する。本発明のモノクローナル抗体は緑膿菌エラスターゼの酵素活性部位に直接相互作用することにより強い阻害活性を発揮し、その結合が金属プロテアーゼ阻害剤により阻害されることを特徴としている。また、本発明のモノクローナル抗体は、緑膿菌エラスターゼに特異的に結合するが、トキシノイド化された緑

膿菌エラスターゼには結合しないことを特徴とする。該モノクローナル抗体は、緑膿菌エラスターゼの毒性中和活性を有するので、有効な緑膿菌感染治療剤を提供する。さらに、本モノクローナル抗体により、極微量の緑膿菌エラスターゼの検出法及び定量法を提供し、緑膿菌感染症診断薬やエラスターゼ定量用試薬として応用される。

【0002】

【従来の技術】細菌感染症の治療において問題となる病原菌は、抗生物質の開発とともに変化している。すなわち、临床上用いられる抗生物質の種類の変遷に伴い細菌感染症を引き起こす細菌、いわゆる起炎菌が交代してきた。従来、低病原性又は弱毒性と言われた細菌、なかでも特に緑膿菌（*Pseudomonas aeruginosa*）による感染症例が増加し、緑膿菌は近年、主要な病原菌の一つとなっている。緑膿菌感染症は、免疫抑制剤の投与を受け免疫能の低下している患者、又は癌患者や熱傷患者および新生児などの免疫不全もしくは免疫能の低下した患者において重篤な症状を引き起こし死に至らしめる場合が多いいわゆる日和見感染として知られている。緑膿菌の病原性因子としては、菌体成分である内毒素、緑膿菌から産生される外毒素・外酵素が挙げられる。緑膿菌臨床分離株の約90%が蛋白質分解酵素である緑膿菌エラスターゼを産生する。緑膿菌エラスターゼは緑膿菌感染部位において生体組織を破壊するのみならず、生体防御物質である免疫グロブリンや補体などの血清成分をも分解し免疫能の低下を引き起こす緑膿菌の重要な病原因子である。細菌感染を予防・治療する方法として、まず第一にあげられるのが、抗生物質および合成抗菌剤を用いた化学療法である。現在まで、β-ラクタム系（ペニシリン系、セファロスポリン系）アミノグリコシド系、マクロライド系などに分類される幾多の抗生物質が開発され、その多くにブドウ球菌を代表とするほとんどのグラム陽性球菌や、大腸菌などのグラム陰性菌が感受性を示し、著効な臨床効果を示してきた。しかしながら、今日までの多くの研究開発にもかかわらず、緑膿菌に感受性を示す薬剤は依然少ないのが現状であり、しかも、耐性菌の出現頻度の高いことがこの菌の感染症をいまだ克服するに至っていない大きな要因となっている。また、抗生物質は細菌の増殖を抑制するものの、感染症の症状を悪化させる細菌の産生する病原性因子、即ち外毒素や外酵素が有する毒性を中和する活性の無いことも抗生物質療法の大きな限界のひとつとして挙げられる。

【0003】ところで、緑膿菌エラスターゼを中和することによる感染症の治療・症状の軽減を目的とした療法として、エラスターゼ阻害剤療法が考えられる。緑膿菌エラスターゼは亜鉛イオンが酵素活性に必須な成分である亜鉛金属プロテアーゼであることが知られている（Morihara et al, *Agricultural and Biological Chemistry* 39, 1123-1128 (1975)）。金属プロテアーゼは微生

物、セイツイ動物に広く分布するプロテアーゼの一種である。金属プロテアーゼグループに属する阻害剤としては、2 価金属イオンのキレート剤であるエチレンジアミン4 酢酸(EDTA), 0-phenanthroline あるいは金属キレートの作用をもつ官能基とペプチド部分から成るホスホラミドン(Suda et al, Journal of Antibiotics 26, 621-623(1973))や $\text{HO-NHCO-CH(CH}_2\text{-CH-(CH}_3\text{)}_2\text{)-CO-Ala-Gly-NH}_2$ (Hudgin et al, Life Sciences 29, 2593-2601 (1981)) 等が知られている。後者の金属プロテアーゼ阻害剤は、金属キレート部分で亜鉛イオンに配位し、その近傍に存在する酵素活性部位に阻害剤のペプチド部分が相互作用して酵素活性を阻害する、いわゆる活性部位指向型の阻害剤である。

【0004】しかしながらこれらの阻害剤は、ホニュウ類における重要な生理活性ペプチドである エンケフェリンやエンドセリンを生成する酵素をはじめとする多くの金属プロテアーゼに属する多くのプロテアーゼに対しても阻害活性を示し、毒性・副作用を示すことが容易に類推され、細菌感染症治療薬としては限界がある。一方、細菌由来の毒素や酵素を中和および阻害することにより細菌感染症を予防および治療すること目的のひとつとした療法として、免疫グロブリン療法(抗体療法)があり、抗生物質療法と併用、もしくはそれに代わるものとして注目される。細菌に限らず毒素・酵素をウマやウサギ等の動物に能動的に免疫することによって該毒素・酵素に対する抗体価の高い血清を得て、その血清を投与する抗体療法は、ヒトに対してはジフテリア毒素や蛇毒の例などで周知のことであるし、さらには各種の動物を用いた実験的感染症において著効な治療効果を示すことが多くの実験にて実証されている。更には、抗体の特異性を鑑みれば、生体内の金属プロテアーゼに対して影響なく、目的の細菌由来酵素のみを中和することは言うまでもない。緑膿菌においては、緑膿菌共通抗原(OEP)、緑膿菌エラスターゼ、緑膿菌プロテアーゼに対する抗体価が比較的高い抗血清(ポリクローナル抗体)から成る免疫グロブリン製剤が知られている。ヒト以外の動物から得られた抗血清がたとえ高力価であったとしても、ヒト以外のいわゆる異種蛋白をヒトの体内に移入する方法はアナフィラキシーやその他のアレルギー反応などの重とく副作用をひきおこす可能性がある。一方、従来のヒト免疫グロブリン製剤は、健常人又は細菌感染既応患者から血液を採取し、既知の方法にて免疫グロブリン画分を分取・精製した後に、ポリエチレングリコール添加、蛋白分解酵素処理、スルホン化、DEAE-カラムクロマトグラフィー等の凝集物を除去する方法により筋肉注射用のみならず、静脈注射用に製剤化されたものである。これらヒト免疫グロブリン製剤は、いくつかの欠点を持つ。第一に、①細菌および細菌由来の毒素・酵素に対する抗体価が低く、必ずしも十分な治療効果を期待しえない。第二に、②高力価の免疫グロブリンを大

量に安定して供給することが難しい。健常人ボランティアや患者より採取された血液を材料に製造されており、高い力価の血清を一定して入手することは極めて難しく、製造ロット毎に、抗体価が変動することがある。第三に、③任意にヒトの血液を材料に製造されることにより、免疫グロブリン製剤にHBs ウイルスなどの肝炎ウイルスやATLV(Adult T cell leukaemia virus)、HIV(Human immunodeficiency virus)、あるいは非A非B肝炎病原ウイルスなどの病原体の混入が起こり得る。かくして、細菌および細菌由来の毒素・酵素、特に、緑膿菌由来のエラスターゼに対して高い抗体価を有し、細菌感染症の治療効果の大きい安全な免疫グロブリン製剤の開発が望まれている。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】PavlovskisとWretlingの緑膿菌エラスターゼに対する抗血清が実験的マウス緑膿菌感染症において著効を示すという報告(Infect. Immun. (1979), Vol. 24, p. 181-187)からも、緑膿菌エラスターゼに対し強い中和活性を有する免疫グロブリン製剤の開発が望まれている。感染症に対して著効のある免疫グロブリン製剤を安定に製造するためには、緑膿菌エラスターゼに対し中和活性を持つモノクローナル抗体の利用が考えられるが、エラスターゼの蛋白分解酵素活性を阻害する、いわゆる中和活性を持つモノクローナル抗体は、今迄に得られていない。緑膿菌エラスターゼに対するモノクローナル抗体に関してはLagaceとFrechetteが報告しているが(Infect. Immun. (1991), Vol. 59, p. 712-715)、彼らは該抗体がエラスターゼに対する中和活性を持つことを示していないし、更に、エラスターゼ産生緑膿菌の感染治療に有効であることをも一切示していない。エラスターゼ中和活性をもつモノクローナル抗体を取得することが極めて困難であることは、エラスターゼが蛋白分解酵素でありモノクローナル抗体自体をも分解し不活性化しうることからも予見される。すなわち、単にエラスターゼに結合するだけのモノクローナル抗体では不適である。即ち、エラスターゼ分子上に無数に存在すると考えられるエピトープ(抗原決定基)のうち、真にタンパク分解酵素活性を阻止しうる、中和活性に寄与しうるエピトープを認識するモノクローナル抗体のみが、適していることになる。現在のエラスターゼに関する知識からでは、緑膿菌エラスターゼに対し強い中和活性を持つモノクローナル抗体を予測することは困難である。一方では、抗体療法以外に毒素・酵素を無毒化したいわゆるワクチンを投与する能動免疫療法がある。緑膿菌においては、緑膿菌共通抗原(OEP)、緑膿菌エラスターゼトキソイド、緑膿菌プロテアーゼトキソイドからなるマルチコンポーネントワクチンの有効性が示されている。(Hommaら、Japanese Journal of Experimental Medicine 48, 111-133 (1987))

【0006】緑膿菌エラスターゼトキソイドとは、ホル

マリン処理 (Homma ら, Japanese Journal of Experimental Medicine 48, 111-133 (1987))、あるいはクロルアセチルペプチド誘導体である $\text{ClCH}_2\text{-CO-OHLeu-Ala-Gly-NH}_2$ (HOLe はN-ヒドロキシ-L-ロイシン) (Moriyama ら, Journal of Clinical Microbiology 23, 53-55 (1986)) と処理することにより酵素活性を欠失し、かつ抗原性保持を目的として調製されたものである。この場合においても、エラスターゼ自身は酵素活性を失っており、肝心の酵素活性部位が壊された状態の蛋白に対する抗体価だけが上昇し、真に酵素の活性中心に結合して活性を中和する抗体価の上昇は望めないことが考えられる。かといって、酵素活性のあるエラスターゼはその毒性故に投与するわけにはいかない。こうした点からも、エラスターゼの酵素活性、即ちその毒性を中和する性質を有する抗体だけからなる免疫グロブリン製剤の有用性は高い。

【0007】

【課題を解決するための手段】こうした状況に鑑み、酵素活性を保持したエラスターゼを免疫原として、緑膿菌エラスターゼに対する多くのモノクローナル抗体を作製し、各モノクローナル抗体の性質を解析することにより、本発明を完成するに至った。具体的には、エラスターゼに対する特異抗体をスクリーニングする方法として、従来から用いられている抗原を固相とする酵素免疫測定法やラジオイムノアッセイではなく、酵素活性の中和作用を判定する方法を開発・採用した。この方法により、従来は、抗原を固相化あるいは放射性同位元素等で標識する際に生じた抗体蛋白質の立体構造 (コンフォメーション) の変化により反応性が消失してしまうようなモノクローナル抗体をスクリーニングすることが可能となった。この方法を用いて、緑膿菌エラスターゼに対する多くのモノクローナル抗体を取得した。各モノクローナル抗体の治療効果を検討する一方、物理化学的、免疫化学的および生物学的特性を詳細に解析した結果、緑膿菌エラスターゼの酵素活性中心部位に直接相互作用し、その蛋白分解活性に対し強い阻害効果を有するモノクローナル抗体を得ることに成功した。

【0008】本発明のモノクローナル抗体は、緑膿菌エラスターゼの毒性中和活性を有することを特徴とする。また、本発明のモノクローナル抗体は、緑膿菌エラスターゼに特異的に結合し、その結合が金属プロテアーゼ阻害剤により阻害されることを特徴とする。さらに、本発明のモノクローナル抗体は、緑膿菌エラスターゼに特異的に結合するが、トキシノイド化された緑膿菌エラスターゼには結合しないことを特徴とする。本発明は、上記の免疫化学的・生物学的特性を有するモノクローナル抗体、該モノクローナル抗体産生セルライン及び該モノクローナル抗体を含む感染治療用の免疫グロブリン製剤に関する。

【0009】緑膿菌エラスターゼと特異的に反応し上記

の特徴を有するモノクローナル抗体を連続的に産生する細胞株は以下の方法で取得される。本発明のハイブリドーマは、免疫、細胞融合、融合細胞選択、アッセイおよびクローニングの五つの工程から成る。免疫工程は、動物 (ヒトを除く) を目的とする抗原で感作する過程である。抗原としては、緑膿菌エラスターゼ精製品をフロインド完全又は不完全アジュバンドと混和した混和物をマウス等の動物に1週間～数か月の間隔で1～6回注射することによって感作する。ヒトにおいてはエラスターゼ産生緑膿菌による自然感染がこの免疫に相当する。抗原の投与経路として腹腔内投与、皮下投与、静脈内投与が考えられるが、特に皮下投与が望ましい。細胞融合2～5日前に緑膿菌エラスターゼ精製品を追加感作することが望ましい。細胞融合工程は、免疫 (感作) された動物から摘出した脾臓細胞またはリンパ球B細胞と骨髄腫細胞とを融合する工程から成る。リンパ球として血清中抗緑膿菌エラスターゼ抗体価が高いヒトの末梢血、脾臓、扁桃腺やリンパ節など由来のリンパ球を用いる事もできる。骨髄腫細胞としては、HPRT (hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase) 欠損マウス骨髄腫細胞であるP3-X63-Ag8-U1 (ATCC CRL1597)、P3-NS-1/1-Ag4-1 (ATCC TIB 18)、P3-X63-Ag8-653 (ATCC CRL1580)、SP2/0-Ag14 (ATCC CRL8287)、SHM-D33 (ATCC CRL 1668) などがその代表として用いられるが、その他、細胞工学分野にて通常用いられる動物およびヒト由来、またはヒト・マウスヘテロミエローマなどの異種間融合細胞由来のイムノグロブリン非産生または非分泌の骨髄腫細胞やBリンパ芽球様細胞をも用いることができる。融合法としてHVJ法 (センダイウイルスを用いる方法)、ポリエチレングリコール法 (PEG法) や電気的融合法等が用いられる。PEG法においては、PEG 1,000-6,000を30-50% (w/v) の濃度で用いる。レクチン、ポリ-L-リジンもしくはDMSOなどを添加することにより融合効率を高めることもできる。融合方法はKoelerとMilsteinの方法 (Nature 256, 495-497. (1975)) に準ずる。

【0010】融合細胞選択工程は、融合細胞のみが生育できる適当な選択培地中で培養することにより融合細胞を選別する工程である。HGPR 欠損骨髄腫細胞を融合親細胞として用いた場合、選択培地としてHAT (Hypoxanthine, Aminopterin, Thymidine) 培地やHAz (Hypoxanthine, Azaserine) 培地を用いる。2～4日毎に新鮮な選択培地に交換し10～20日間培養する。その他、アクチノマイシンD・エメチン併用法、ジメチルピロカーボネイト法、ウアバイン法等公知の方法が用いられる。アッセイ工程は、融合細胞のなかから、目的とする特異抗体産生細胞を選別する工程である。抗原となる蛋白質の活性の中和能、即ち本発明においては緑膿菌エラスターゼの基質となるエラスチンなどの蛋白質やペプチドの加水分解の阻害活性によって抗体を選別する。クローニング工程は、目的の特異抗体産生細胞を一つのクローンから由来

した均一な細胞集団とする工程である。限外希釈法、軟寒天法、単細胞マニピレーション(Single cell manipulation)法などによって、モノクローン(単一性クローン)から由来した緑膿菌エラスターゼと反応する抗体を産生する細胞株、所謂ハイブリドーマを得る。

【0011】このハイブリドーマを公知の方法、例えば、DNA変異剤などの化学的処理およびUV照射など物質的処理により、増殖能や抗体産生能を高めるなどの改良を加えたハイブリドーマ子孫細胞を得ることができる。この子孫細胞が親ハイブリドーマと同じく、本発明に記載の生物学的・物理学的特性を保持していることは言うまでもない。また、このハイブリドーマから公知の方法、例えば、Molecular Cloning、(Cold Spring Harbor Laboratory) 記載の方法により抗体遺伝子ないし抗体可変領域遺伝子をクローニングし該遺伝子を含む発現プラスミドを作製、動物細胞を宿主として発現せしむる事により本発明記載の抗体と同様の生物学的・物理学的性質を有する抗体を得ることができる。また公知の方法、例えば Morrison 等の方法(Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol. 81, pp.6851-6855 (1984))により抗体可変領域遺伝子がヒト抗体定常領域遺伝子等他の適当な遺伝子と結合した新規遺伝子を構築し、該遺伝子を含む発現プラスミドを動物細胞ないし微生物を宿主として発現せしむる事により本発明の抗体と同一の可変領域を有しかつ本発明の抗体と同様の生物学的活性を有するハイブリッド分子を得ることが可能である。本発明の抗体は、該ハイブリドーマを試験管内で無血清培地や血清を含む通常の動物細胞用培地で培養した培養上清、又はブリスταν(2,6,10,14-tetramethylpentadecane, Aldrich社)あるいはフロイント不完全アジュバントを前投与したマウス等の動物に接種し、生体内培養することによって得た生体浸出液から精製される。すなわち得られた培養上清又は生体浸出液を通常の蛋白精製に用いられる生化学的手法、例えば硫酸アンモニウムによる沈澱法、イオン交換クロマトグラフィー法、ゲル濾過法および、プロテインA、プロテインGに代表される抗体結合蛋白質を樹脂に固定化したアフィニティークロマトグラフィー法に供することによって精製される。

【0012】精製されたモノクローナル抗体は、生物学的製剤の製剤化に通常用いられる方法によって製剤化される。基本的には、メンブレンフィルター等による濾過除菌操作の後に、滅菌バイアルに充填される。凍結乾燥されることもある。更には必要に応じて安定化剤が添加される。本モノクローナル抗体製剤は、細菌感染治療・予防剤として、緑膿菌エラスターゼに対する1種類のモノクローナル抗体より成ることも可能であるが、更に好ましくは、緑膿菌エラスターゼ分子の異なる抗原決定部位を認識しうる、少なくとも2種類又はそれ以上のモノクローナル抗体と混合して用いられる。又は緑膿菌エラスターゼ以外の緑膿菌由来抗原、例えば外毒素、プロテ

アーゼなどの緑膿菌外毒素や外膜蛋白・内毒素構成成分などを認識する従来型の抗体と混合して使用される。更には、緑膿菌以外の細菌、ウイルス、真菌、原虫、癌細胞に対する抗体に、本発明によって得られる緑膿菌エラスターゼに対するモノクローナル抗体を添加して用いることができる。従来の免疫グロブリン製剤に、本発明によって得られるモノクローナル抗体を添加して、エラスターゼに対する高力価免疫グロブリン製剤とされる。本発明によって得られるモノクローナル抗体は主としてクラスIgGに属するがこれに限定されたものではない。本モノクローナル抗体は、前記の特性を持つモノクローナル抗体であれば、マウス抗体、ヒト抗体、マウス・ヒト・キメラ抗体、クラス・サブクラス変換抗体など、すべて含まれる。さらに緑膿菌エラスターゼに対し中和効果を有する抗体のFab断片、Fv断片も含まれる。本発明のモノクローナル抗体を利用する緑膿菌エラスターゼの定量およびエラスターゼ産生緑膿菌感染症の診断としては、通常の抗体を用いる免疫化学的定量法および診断法が考えられ、当該モノクローナル抗体が利用可能であれば制限はない。例えば、酵素免疫測定法、ラジオイムノアッセイおよび凝集法等が例示される。

【0013】

【実施例】次に実施例をあげて本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はこれのみに限定されないことは言うまでもない。緑膿菌エラスターゼ抗体の検定に用いた従来のELISA法を以下に示す。

(1) ELISA プレートの調製

緑膿菌エラスターゼをリン酸緩衝液(pH7.2; 組成NaCl(8g/l), KCl(0.2g/l), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (2.99g/l) および KH_2PO_4 (0.2g/l)) : 以下PBSと略す)へ10 $\mu\text{g/ml}$ の濃度に溶解し96ウェルマイクロプレート(ファルコン #3912)(マイクロプレートと略)に1ウェル当たり100 μl ずつ分注、4℃で一晩インキュベートした。マイクロプレートからエラスターゼ溶液を除去した後3%ウシ血清アルブミン(以下BSAと略称する)PBS溶液を1ウェルあたり120 μl ずつ分注し37℃にて30分間インキュベートすることによりエラスターゼの未吸着部分をブロッキングしたマイクロプレートを抗原吸着プレートとして以後の操作に用いた。

【0014】(2) ELISA

アッセイ前に抗原吸着プレートを5mM EDTAと0.05%Tween 20を含有するPBS(以下PBSTと略)で3回洗滌した。その後PBSTを1ウェルあたり50 μl 分注、必要に応じてPBSTで適宜希釈した試料(血清又は培養上清)を1ウェルあたり50 μl 加え、37℃で2時間インキュベートした。その後試料を除去し、PBSTで3回洗滌した。続いて第2抗体液を1ウェルあたり100 μl ずつ加え、37℃で2時間インキュベートした。抗体価の測定には第2抗体としてPBSTで500~1,000倍希釈した

ホスファターゼ標識アフィニティ精製抗マウス免疫グロブリン抗体 (Kirkegaard & Perry Lab. Inc.) を用いた。第2抗体を除去し、PBSTで3回洗滌後、発色基質溶液 (3mgのp-ニトロフェニルリン酸-2-ナトリウム塩を1mlのNa₂N₃ (0.2mg/ml), MgCl₂・6H₂O (0.1mg/ml) を含む10%ジエタノールアミン緩衝液 pH9.1に溶解した水溶液) を1ウェル100μlずつ加え、37℃で反応させた。30分間反応後の405nmの吸光度 (A₄₀₅) をマルチスキャン (Titertek) で測定した。また、本明細書におけるエラスチン分解活性の中和による抗エラスターゼ抗体の検出は以下に示す方法に従った。1mM CaCl₂ を含有した0.1M トリス・マレイン酸緩衝液 (pH 7.0) (以下、緩衝液I とする) に10 mg/ml の濃度でFITC (fluorescein isothiocyanate)-標識エラスチン (Elastin Products Company, ミズリー) を懸濁した基質溶液 60 μl, 緩衝液I に0.3 μg/ml の濃度で溶かしたエラスターゼ溶液 60 μl 及びハイブリドーマ培養上清 (コントロールには培地を使用した) 60 μl をV字底96ウェルマイクロプレートに分注し、37℃, 2時間インキュベートする。プレートを3000 rpm, 5 min で遠心した後、上清100 μl を回収し、96ウェル平底プレートに移す。この上清中の遊離のFITC量をコロナマイクロプレートリーダーMTP-32 (Corona Electric Co., Ltd., 茨城, 日本) を用いて蛍光強度として測定した。エラスチン分解阻害活性は、[(培養上清添加時での蛍光強度) - (バックグラウンド)] / [(培地のみ添加での蛍光強度) - (バックグラウンド)] である。ただしバックグラウンドはエラスターゼ非存在下での蛍光強度を表す。

【0015】実施例1. マウスモノクローナル抗体の作製

(1) 抗原の調製

市販緑膿菌エラスターゼ精製品 (長瀬生化学) を使用した。緑膿菌エラスターゼをリン酸緩衝液 (pH 7.2; 組成 NaCl (8 g/l), KCl (0.2 g/l), Na₂HPO₄・12H₂O (2.99 g/l)) およびKH₂PO₄ (0.2 g/l) : 以下PBSと略す) に対し透析し免疫原として用いた。

(2) 免疫脾臓細胞の調製

BALB/cマウス (雌、初回免疫時4週令、体重約15 g) を免疫に供した。緑膿菌エラスターゼを1 mg/ml の濃度で含有するPBS 1容とフロイント完全アジュバント1容を

常法に従い混和し、マウス一匹あたり混和液) 0.2ml

(緑膿菌エラスターゼ 0.5 μg を含有) を皮下投与することによって初回免疫した。以後、2週間隔にて4回、フロイント不完全アジュバントと混和した緑膿菌エラスターゼを100 μg皮下投与し、追加免疫を行なった。最後の追加免疫の約1ヶ月後、緑膿菌エラスターゼ100 μg を静脈内投与する事により最終免疫した。3日後に脾臓を摘出、イーグルのMEM培地 (半井化学) に懸濁された脾臓細胞を得た。

(3) 細胞融合

マウス骨髄腫細胞 P3X63-Ag8-653 (ATCC CRL1580) を10% ウシ胎児血清FCS (Gibco) 添加RPMI-1640 培地 (半井化学) 中で培養し、対数増殖期で細胞を集め細胞融合に用いた。融合方法は、Koehler ら (Nature, 256, 495-497, 1975) の方法に準じた。即ち、脾臓細胞と骨髄腫細胞とを5:1の比率で血清不含のRPMI-1640 培地に懸濁し、1,000rpm (トミー精工CD-100R) にて7分間遠心分離した。沈査に、37℃に保温された45% (W/W) ポリエチレングリコール (PEG) 4000, 10% (V/V) ジメチルスルホキシドの溶液1ml を1分間かけて添加し、さらに37℃にて1分間静置した。

【0016】次いで、血清不含RPMI-1640 培地2ml を1ml / 1minの割合で加え懸濁した。更に、血清不含 RPMI-1640培地7ml を徐々に加え PEGを希釈した。37℃、20分間静置の後1,000rpmで7分間遠心分離、その後マウス骨髄腫細胞として6×10⁴ 細胞/mlの細胞濃度が得られるように、10%FCS 含有 RPMI-1640培地に再懸濁し、96穴マイクロプレート (住友ベークライトMS-3096F) に0.2 ml / ウェルずつ分注した。この融合細胞を5%CO₂ において37℃で培養した。細胞融合の1日後に、半分量の培地を新たな HAT培地 (10⁻⁴M ヒポキサンチン、4×10⁻⁷M アミノプテリン、1.6×10⁻⁵M チミジンを含むRPMI-1640 培地) と交換した。以後、2日毎にHAT培地による半量交換を3回行った。10日後には、70%のマイクロプレート穴で、細胞の増殖が観察された。ELISA もしくはエラスチン分解の中和活性によるアッセイの結果、42ウェルで特異抗体の産生が認められた。代表的な陽性例を表1に示す。

【0017】

【表1】

緑膿菌エラスターゼに対するマウスモノクローナル抗体

抗体産生細胞	ELISA(A ₄₀₅)	エラスチン分解 阻害活性 (%)
ET-2-4	1.9	63
ET-2A5	1.4	49
ET-2B1	1.6	55
ET-4D3	0	71
ET-6A5	> 2.0	84
ET-2-1	1.0	52
ET-7B2	0.7	39
ET-7B5	1.6	72

【0018】(4) 腹水化

4週間前にプリスタン (2, 6, 10, 14-テトラメチルペンタデカン; Aldrich Chemical Co. Inc., Wisconsin) を一匹あたり0.5 mlにて投与したBalb/Cマウスに、クロニング後試験管内培養にて増殖させたハイブリドーマ 5×10^6 細胞を腹腔内へ接種し、7~14日後、マウスの腹腔より腹水を採取した。

(5) 精製

マウス腹水をプロテインAモノクローナル抗体精製システムMAPSII (Bio-Rad; New York) にて精製した。すなわち、腹水を脱リピド液 (Repligen Corp.) で処理後、100,000xg, 1h, 15℃の超遠心を行う。得られた腹水とMAPSII結合バッファーpH 9.0 (Bio-Rad) を1:1に混合し、アフィゲルプロテインAカラム (Bio-Rad) に供した後、前出の結合バッファーで洗浄した。MAPSII溶出バッファー (pH3.0; Bio-Rad) で溶出後ただちにPBS に対して透析して、精製標品とした。

【0019】実施例2. モノクローナル抗体の性状検討

(1) In vitroエラスターゼ中和試験

1) ウシ血清アルブミンを基質としたSDS-PAGEによる定性的解析

緑膿菌エラスターゼとウシ血清アルブミン(BSA) を表1に示したマウスモノクローナル抗体の存在下反応させ、緑膿菌エラスターゼによるウシ血清アルブミンの分解に対する抗体の影響をSDS-PAGEにより解析した。緑膿菌エラスターゼ (0.1 μ g/ml, 10 μ l) にマウスモノクローナル抗体 (腹水 10 μ l) を添加し37℃, 30分ブレインキュベートした後、BSA (5 mg/ml, 100 μ l) を加え37℃2時間反応させた。反応混合物を2%SDS, 5% 2-メルカプトエタノール、10%グリセロールを含む 125mM トリス塩酸緩衝液pH 6.8中で 100℃、5分間加熱処理

し、10-20% linear gradientのアクリルアミド濃度でSDS/ポリアクリルアミドゲル電気泳動をおこなった。ゲル上の蛋白をクマジー・ブリリアント・ブルーにより染色、BSAの分解を観察した。緑膿菌エラスターゼ・抗体無添加の条件で認められたBSAのバンドは緑膿菌エラスターゼの添加により完全に分解された。ET-4D3の添加により緑膿菌エラスターゼによるBSAの分解は阻害されBSAのバンドが認められた。一方、他のモノクローナル抗体の添加ではBSAの分解は影響を受けなかった。

【0020】(2) FITC-エラスチンを基質とした定量的解析

緑膿菌エラスターゼの酵素活性をFITC-標識エラスチン (エラスチン・プロダクツ・カンパニー、ミズーリ) を基質として用いた反応系に、モノクローナル抗体を共存させたときの影響を検討した。エラスターゼによるエラスチンの分解はその分解にともなって可溶化されたFITCを指標とした。緑膿菌エラスターゼ (10, 30 μ g/ml; 75 μ l) にマウスモノクローナル抗体ET-4D3またはET-2B1 (100 μ g/ml; 75 μ l) を添加し37℃, 30分ブレインキュベートした後、FITC-標識エラスチン (5 mg/ml; 150 μ l) を加え37℃ 3時間暗所にて反応した。反応混合物から標識エラスチンを遠沈除去し上清100 μ lを採取、96穴プレートに分注した。上清に含まれるFITCの量を96穴プレート用自動光度計 (コロナ MTP-32) を用い測定した。結果を表2に示す。いずれのモノクローナル抗体も緑膿菌エラスターゼによる蛋白分解を阻害した。ET-4D3は抗体1分子又はそれ以上の分子で緑膿菌エラスターゼ1分子を50%以上阻害した。一方 ET-2B1による分解の阻害は ET-4D3と比較し弱かった。

【0021】

【表2】

緑膿菌エラスターゼの蛋白分解に対するモノクローナル抗体の阻害活性

エラスターゼ濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	モル比 (ET/IgG)	モノクローナル 抗体	可溶化FITC (nM)	阻害活性 (%)
0	—	—	0	—
		ET-2B1	0.03	—
		ET-4D3	0.03	—
2.5	1.5	—	1.8	—
		ET-2B1	0.58	68
		ET-4D3	0.20	89
7.5	0.5	—	2.5	—
		ET-2B1	2.4	4
		ET-4D3	1.0	60

【0022】3) 合成基質を用いた緑膿菌エラスターゼ酵素活性のモノクローナル抗体ET-4D3の中和活性
緑膿菌エラスターゼの酵素活性を合成基質であるフリル
アクリロイル-グリニル-ロイシン アミド (以下、F
AGLAと略記; ペプチド研究所 (大阪)) を用いて測
定した。この反応系にET-4D3を添加して酵素活性
中和能を検討した。0.1Mトリス-マレイン酸緩衝液
(pH7.0)に2.5mMの濃度で溶解したFAGLA
200 μl に緑膿菌エラスターゼ (長瀬生化学より購
入) 0.5 μg 、更に種々の濃度のET-4D3のPB
S (—) 溶液100 μl を混和、37℃1時間インキュ
ベートした後、0.7Mリン酸ナトリウム緩衝液 (pH
6.0)を400 μl 添加して反応を停止させた。酵素
を添加していない反応混液を作製し対照とし、345n
mの吸光度の減少 (対照の吸光度) - (反応後の吸光
度) を測定、酵素1 μg 、1時間あたりの吸光度変化

($-\Delta A_{345} / \text{h} \cdot \mu\text{g}$ 蛋白) を酵素活性とした。ET
-4D3の中和能は、添加していないときの酵素活性を
100%として、相対残存酵素活性で表した。抗体の比
較対象としてマウス抗エラスターゼ抗体ET-2B1、
酵素 (エラスターゼ) の比較対象として緑膿菌エラス
ターゼと酵素活性部位の類似した金属プロテアーゼ (Beve
rとIglewski, Journal of Bacteriology 170, 4309-431
4 (1988)) であるサーモリシン (Bacillus thermoprot
eolyticus rokko株由来、シグマ社) 0.3 μg を用
いた。結果を表3に示す。合成基質を用いた場合、ET
-4D3のみに中和活性が認められ、ET-2B1では
全く中和活性を認めなかった。さらに、ET-4D3、
ET-2B1ともにサーモリシンに対する中和活性は全
く認められなかった。

【0023】

【表3】

マウス抗緑膿菌エラスターゼモノクローナル抗体ET-4D3の酵素活性中和能

酵素	抗体	抗体量 (μg)	モル比 (ET/IgG)	阻害活性 (%)
エラスターゼ	ET-4D3	10	0.5	100
		5	1	88
		2	2.5	53
エラスターゼ	ET-2B1	20	0.25	3
		10	0.5	0
		5	1	0
サーモリシン	ET-4D3	20	0.065	2
		2	0.65	0

表3より、少なくとも1分子の抗体が緑膿菌エラスターゼ1分子の蛋白分解酵素活性を50%阻害することが

判明した。

【0024】実施例3. 抗エラスターゼ抗体ET-4D3のFab断片の調製と該断片によるエラスターゼの中和活性

(1) モノクローナル抗体ET-4D3のFab断片の調製

モノクローナル抗体ET-4D3 (PBS (-) 溶液) 10mgを20mMリン酸/10mM EDTA緩衝液 (pH7.0) に対して透析した後、限外濾過装置にて約0.5mlまで濃縮した。得られたIgG溶液 (0.5ml) と20mMのシステイン塩酸を添加した20mMリン酸緩衝液 (pHを7.0に調整) 0.5mlとを混和し、さらにパパイン固定化Agarose (PIERCE, Rockford, Illinois USA) の懸濁液を1ml添加し、激しく攪拌しながら37℃で1時間インキュベートした。反応後、固定化パパインを濾別した。得られた濾液にAffi-Prep Protein A MAPS II Binding buffer (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA USA) を等量添加し、Protein

A-Cellulofine (生化学工業) カラム (φ0.8cm x 2cm) に供した。Affi-Prep Protein A Binding bufferでカラムを洗浄し、索通りの画分を適当な量にまで濃縮し、Superose 6カラム (φ1cm x 30cm; PharmaciaLKB, Uppsala, Sweden) にてゲル濾過を行い、280nmの吸光度で検出した蛋白画分を集め、ET-4D3のFab断片標品とした。

(2) モノクローナル抗体ET-4D3のFab断片による合成基質を用いた緑膿菌エラスターゼ酵素活性の中和

ET-4D3のFab断片の酵素活性中和の有無を実施例2-(3)に従ってフリルアクリロイル-グリシル-ロイシン アミド (FAGLA) を用いて検討した。検討条件は実施例2-(3)に準じて実施した。結果を表4に示す。

【0025】

【表4】

緑膿菌エラスターゼのFAGLA分解活性に対するモノクローナル抗体ET-4D3及び該抗体由来のFab断片の中和活性

添加試料	蛋白量 (μg)	阻害活性 (%)
ET-4D3 IgG	5.6	73
	1.9	15
ET-4D3 Fab断片	5.6	90
	1.9	23

【0026】(3) ET-4D3のFab断片による蛍光標識エラスチンを基質として用いた緑膿菌エラスターゼ活性の中和

ET-4D3のFab断片のエラスターゼ活性の中和を実施例3-(2)と同様にFITC-標識エラスチンを用いて検討した。ET-4D3もしくはET-4D3のFab断片のPBS (-) 溶液100μl, 0.1Mトリスマレイン酸緩衝液 (pH7.0) に10mg/mlの濃度で懸濁したFITC-エラスチン懸濁液100

μl, 及びエラスターゼ溶液 (200μg/ml) 5μlを混和、激しく攪拌しながら37℃, 2時間インキュベートした。反応後、混液を10,000rpm, 3分間遠心して得られた上清のうち100μlを回収し、上清中のFITC量を実施例2-(2)に従って測定した。結果を表5に示す。

【0027】

【表5】

エラスターゼのFITC-エラスチンを基質として用いたときのET-4D3及び該抗体のFab断片の酵素活性中和能

添加試料	蛋白量 (μg/ml)	阻害活性 (%)
ET-4D3 IgG	4.4	67
	1.5	35
ET-4D3 Fab断片	4.4	82
	1.5	43

【0028】以上の結果から、ET-4D3は、Fab断片でもインタクトのIgGと同等に緑膿菌エラスターゼに対する高い中和活性を有することが示された。即

ち、酵素中和活性は、基質として合成ペプチド基質もしくは蛍光標識エラスチンいずれを用いたときでも、ET-4D3及び該抗体のFab断片に同様の中和活性が認

められた。

【0029】実施例4. モノクローナル抗体とエラスターゼの結合に対する各種金属プロテアーゼ阻害剤の影響

(1) ゲル濾過法による抗原抗体結合反応の解析

抗原であるエラスターゼとモノクローナル抗体の結合をゲルクロマトグラフィーで解析した。モノクローナル抗体(10 μ g)とエラスターゼ(4.3 μ g)を混和し、PBSで最終容量を500 μ lとした直後にSuperose 6 カラム(ϕ 1cm x 30cm)に供した。この際のモノクローナル抗体とエラスターゼのモル比は1:2である。280nmの吸収で蛋白の溶出位置を知った。結果を図1に示した。エラスターゼ単独(イ)では29.3分、モノクローナル抗体(ロ)はクロンに関わらず24.9分、エラスターゼと抗エラスターゼモノクローナル抗体のモル比2:1の混合物(ハ)では抗原-抗体複合体が23.8分の溶出時間に認められた。

(2) 金属プロテアーゼ阻害剤による抗原-抗体の結合に及ぼす影響

エラスターゼ(4.3 μ g)、モノクローナル抗体(10 μ g)およびエラスターゼの酵素活性を100%阻害できる濃度の金属プロテアーゼ阻害剤を混和、最終容量を500 μ lとして、実施例4-(1)に従ってSuperose 6カラムに供した。なお、ホスホラミドンはペプチド研究所より、HO-NHCO-CH(CH₂-CH-(CH₃)₂)-CO-Ala-Gly-NH₂はCalbiochem Corp. (San Diego, CA, USA)より、エチレンジアミン四酢酸(EDTA)およびo-phenanthrolineは同仁化学より購入した。結果を図2に示す。ET-4D3のエラスターゼへの結合は100 μ Mのホスホラミドンもしくは10 μ MのHO-NHCO-CH(CH₂-CH-(CH₃)₂)-CO-Ala-Gly-NH₂の添加によって阻害された(図2-イ, ロ)。一方、EDTAおよびo-phenanthrolineに関しては、エラスターゼ活性をほぼ100%阻害する量の10倍量(1mM)添加してもET-4D3とエラスターゼの結合に対して影響は認められなかった(図2-ハ, ニ)。また、表1に示したET-4D3以外の抗エラスターゼモノクローナル抗体についてはいずれの阻害剤を添加しても、抗原抗体反応に対する影響は全く認められなかった。以上の結果は、ET-4D3の抗原結合能が、エラスターゼの活性部位に指向性のある阻害剤(ここではホスホラミドン、HO-NHCO-CH(CH₂-CH-(CH₃)₂)-CO-Ala-Gly-NH₂)によって特異的に阻害されることを示している。一方、エラスターゼの酵素活性に必須な亜鉛イオンを金属キレート剤で取り除くことでは、ET-4D3を初めとしてどのモノクローナル抗体もその抗原結合能に影響は認められなかった。

【0030】(3) エラスターゼトキシノイドに対するモノクローナル抗体ET-4D3の結合性

エラスターゼ・トキシノイドの調製は、以下の方法で行っ

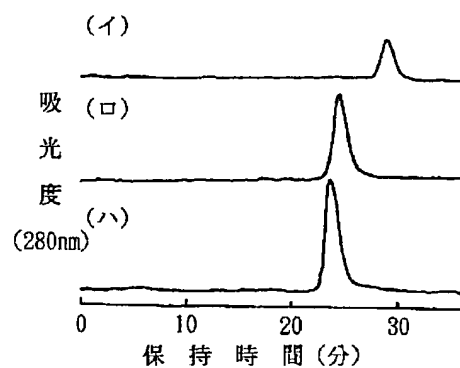
た。市販緑膿菌エラスターゼ(長瀬生化学)を0.1M トリス緩衝液(pH7.5; 2mM CaCl₂ 含有)に対し1晩透析した後、蛋白濃度が0.5mg/mlとなるように調製した。Moriyamaの方法(Journal of Clinical Microbiology 23, 53-55 (1986))に従って作製したエステラーゼ・トキシノイドをトキシノイド-Iと呼ぶ。具体的には(ClCH₂-CO-HOLeu-Ala-Gly-NH₂、ペプチド研究所)を1mg/mlの濃度になるよう添加し室温にて1晩反応し、トキシノイド-I標品を作製した。さらに、ホルマリンを用いて本間等の方法(Japanese Journal of Experimental Medicine 48, 111-133 (1978))に従って作製したトキシノイドをトキシノイド-IIと呼ぶ。具体的には、エラスターゼ(最終濃度2mg/ml)を4%ホルマリン/0.2Mほう酸緩衝液(pH9.0)で4℃、一夜反応させる。得られた生成物をSephadex G-50 (Pharmacia LKB カラムクロマトグラフィーに供し、分子量約25,000-50,000に相当する蛋白画分をプールしてトキシノイド-II標品とした。2種のトキシノイドに対するET-4D3の結合性をSuperose 6ゲル濾過クロマトグラフィーによって検討した。実験条件は実施例3-(1)に従った。結果を図2に示す。ET-4D3はトキシノイド-I, トキシノイド-IIいずれに対しても全く結合性を示さなかった(図2-ホ, ト)。一方、表1に示したET-4D3以外の抗エラスターゼ抗体に関してはいずれもトキシノイド-Iに、定量的に結合した。(図2-ヘ)

【図面の簡単な説明】

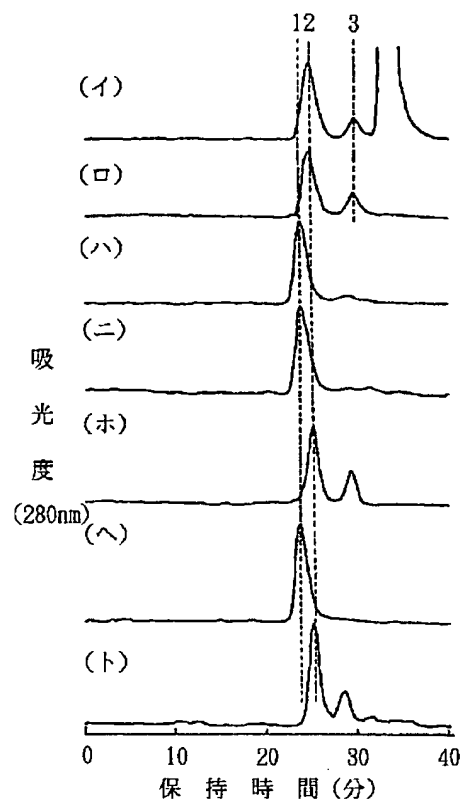
【図1】抗エラスターゼモノクローナル抗体とエラスターゼの結合性のSuperose 6ゲルクロマトグラフィーによる解析。(イ)はエラスターゼ、(ロ)はET-4D3、(ハ)はET-4D3とエラスターゼをモル比1:2で混合したもの。

【図2】モノクローナル抗体ET-4D3とエラスターゼの結合に対する各種金属プロテアーゼ阻害剤の影響、およびET-4D3のエラスターゼトキシノイドに対する結合性のSuperose 6ゲルクロマトグラフィーによる解析いずれも、ET-4D3とエラスターゼ(もしくはそのトキシノイド)はモル比1:2で混和している。(イ)はホスホラミドンを100 μ M添加、(ロ)はHO-NHCO-CH(CH₂-CH-(CH₃)₂)-CO-Ala-Gly-NH₂を10 μ M添加、(ハ)はEDTAを1mM添加、(ニ)はo-phenanthrolineを1mM添加時におけるクロマトグラム。(ホ)はET-4D3とトキシノイド-I、(ヘ)はET-2B1とトキシノイド-I、(ト)はET-4D3とトキシノイド-IIをそれぞれモル比1:2で混和したときのクロマトグラム。破線1, 2, 3は、それぞれ図1で求めたモノクローナル抗体/エラスターゼ複合体、モノクローナル抗体、エラスターゼの溶出位置を示す。

【図1】



【図2】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 7 K 15/28		7731-4H		
C 1 2 N 5/20				
G 0 1 N 33/573		A 9015-2 J		
33/577		B 9015-2 J		
// C 1 2 N 15/06				
G 0 1 N 33/569		D 9015-2 J		
(C 1 2 P 21/08				
C 1 2 R 1:91)				

(72)発明者 野口 浩
 兵庫県宝塚市高司4丁目2番1号 住友化学工業株式会社内